

Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Potensial Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Aeromonas hydrophyla* dari Kulit batang Tumbuhan *Aveccennia spp.*

Identification of Secondary Metabolite Compounds that Potential to Inhibit *Aeromonas hydrophyla* growt from tree bark of *Aveccennia spp.*

Darminto¹⁾, Alimuddin Ali²⁾, Iwan Dini³⁾

^{1,3} Dosen Jurusan Kimia dan ²⁾ Dosen Jurusan Biologi FMIPA UNM

ABSTRAK

Tumbuhan mangrove berpotensi memetabolisme senyawa yang sebagai anti bakteri yang diketahui dari hasil uji ekstrak kulit batang tumbuhan *Aveccennia spp.* terhadap bakteri *Aeromonas hydrophyla*. Penelitian ini menindak lanjuti hasil tersebut untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder dengan melakukan identifikasi terfraksinasi dilanjutkan dengan fraksinasi dan purifikasi ekstrak. Hasil menunjukkan adanya kandungan senyawa metabolit sekunder; golongan terpenoid, steroid, alkaloid, dan flavanoid pada tumbuhan *Aveccennia spp.*

Kata Kunci; *Aveccennia spp.*, *A. hydrophyla*.

ABSTRACT

The Mangrove plant have potential to metabolism compounds as to against bacterium. This know at test of the tree bark extract of *Aveccennia spp.* plant to *Aeromonas hydrophyla*. The Research to continue to know the content of secondary metabolite compounds by fractionation, identification and purification of extract. The result shown there are; terpenoid, steroid, alkaloid, and flavanoid content of *Aveccennia spp.* plant.

Key word; *Aveccennia spp.*, *A. hydrophyla*.

A. PENDAHULUAN

Senyawa metabolit sekunder merupakan sumber bahan kimia alami yang dapat ditemukan di alam untuk dijadikan sebagai rujukan untuk pengembangan obat-obatan khususnya obat baru atau untuk menunjang berbagai kepentingan industri. Bahan ini tidak akan pernah habis dan terus akan tercipta dengan struktur molekul yang mengalami interkonversi sejalan dengan perkembangan zaman. Dengan demikian senyawa yang bersumber dari alam akan terus ada tercipta baik yang sudah pernah ditemukan maupun yang baru dan belum diketemukan.

Bahan alam yang jumlahnya tidak terbatas ini menjadi potensi tersendiri khususnya kimia bahan alam dalam

bidang isolasi senyawa bahan alam. Senyawa metabolit sekunder yang telah ditemukan sudah sangat banyak tetapi belum maksimal dibandingkan dengan potensi sumbernya. Ini didukung oleh fakta bahwa di muka bumi ini terdapat lebih kurang 250.000 jenis tumbuhan tingkat tinggi, akan tetapi baru lebih dari 0,4 % yang sudah diselidiki kandungan kimianya. Disamping itu dengan kemajuan bidang bioteknologi, tumbuhan yang telah diketahui memetabolisme senyawa yang berguna dapat ditingkatkan kualitasnya melalui kultur jaringan atau pembentukan tumbuhan transgenik yang akan menghasilkan berbagai jenis senyawa metabolit sekunder baru yang beraneka ragam dan mungkin juga dengan struktur molekul yang berbeda

dengan yang ditemukan dari tumbuhan awalnya. Dengan demikian peluang penelitian dalam bidang bahan alam adalah juga tidak terbatas.

Pencarian senyawa metabolit sekunder khususnya senyawa yang berkhasiat sebagai obat-obatan, pestisida, anti bakteri patogen dan sebagainya sudah banyak dilakukan pada tumbuhan jenis mangrove. Tumbuhan ini merupakan salah satu tumbuhan tropis yang mudah berkembang namun belum banyak digunakan untuk orientasi ekonomi dari senyawa bioaktif yang dikandung. Upaya untuk mendapatkan senyawa bioaktif dari sumber daya laut terus digalakkan. Seperti pencarian senyawa bioaktif antibakterial pada spons laut (Linington *et al*, 2002) dari siput bakau (Alimuddin *et al*, 2006) telah dilakukan, namun potensi senyawa pada tumbuhan mangrove sebagai kandidat fitofarmaka budidaya perairan yang kemungkinan memiliki potensi farmakologik yang sama sebagai antimikrobia belum banyak dikaji.

Tumbuhan mangrove di Indonesia merupakan yang terbanyak di dunia, baik dari segi kuantitas area ($\pm 42.550 \text{ Km}^2$) maupun jumlah spesies (± 45 spesies) (Spalding *et al*, 2001). Sebagian besar dari tumbuhan mangrove digunakan sebagai bahan obat. Ekstrak dan bahan mentah dari tumbuhan mangrove telah digunakan oleh masyarakat pesisir untuk keperluan pengobatan alamiah. Kandungan saponin triterpenoid dari *Acanthus illicifolius* menunjukkan aktivitas leukimia, paralysis, asma, rematik serta anti peradangan; dan Alkaloid dari *Antrioleks vesicaria* juga berkhasiat sebagai senyawa bakterisida (Purnobasuki, 2004). Penelitian terhadap ekstrak metanol dari batang tumbuhan bakau jenis *Rhizophora* spp mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji

Vibrio harveyi dan *A. hydrophyla*. (Alimuddin, 2006). Ekstrak metanol dari pelepah nipah juga mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji (*inhibition zone*). (Alimuddin dan Henny Linda, 2007). Uraian tersebut menunjukkan potensi tanaman mangrove untuk diarahkan dalam mengkaji pemanfaatan sumber daya laut yang berpotensi farmakologik. Dengan demikian, daya anti bakteri ekstrak kulit batang dan tumbuhan *Avicennia* sp sebagai salah satu spesies tumbuhan mangrove dapat diuji terhadap *A. hydrophyla*.

Penelitian tentang daya hambat ekstrak kulit batang tumbuhan *Avicennia* spp. terhadap bakteri *Aeromonas hydrophyla* menunjukkan adanya daya hambat yang potensial (Darminto, 2009) Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan yang dilakukan untuk mengetahui kandungan golongan senyawa metabolit sekunder dari tumbuhan mangrof jenis *Avicennia* spp..

BAHAN DAN METODE

A. Objek Penelitian

Objek penelitian adalah tumbuhan mangrove jenis *Avicennia* spp. Bahan tanaman yang digunakan adalah kulit batang tumbuhan yang diambil dari Kabupaten Luwu. Pengambilan bahan dilakukan dengan cara menguliti batang dari pohon, dikumpulkan dan dibersihkan dan dibiarkan kering diudara atau diangin-anginkan. Setelah kering selanjutnya dihaluskan sampai berbentuk tepung.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan terdiri dari beberapa alat-alat yang sering digunakan seperti; seperangkat alat destilasi, corong Buchner, chamber untuk wadah KLT, pipa kapiler untuk penotol, kemudian alat kolom kromatografi yang utama seperti

Kolom Kromatografi Vakum dan Kolom Kromatografi Tekan yang digunakan untuk fraksinasi ekstrak dari proses maserasi. Kemudian beberapa alat instrumen seperti; oven, lampu UV 254 nm, neraca analitik, evaporator, alat penentuan titik leleh mikro dan elektrotermal untuk menentukan titik leleh, dan botol fraksi.

Bahan-bahan yang digunakan yaitu kulit batang tumbuhan paliasa, pelarut-pelarut yang berkualitas teknis yang telah didestilasi seperti metanol yang digunakan untuk maserasi, kloroform, etilasetat, n-heksan, dan aseton, untuk fraksinasi. Pelarut berkualitas (pa) digunakan pada proses kristalisasi dari senyawa yang berbentuk kristal yang diperoleh, Larutan serum sulfat (CeSO_4) 2 % dalam asam sulfat 2 N sebagai larutan penyempnot plat KLT untuk penampak noda. Pereaksi Liebermann Burchard untuk uji kualitatif senyawa terpenoid, pereaksi Dragendroff untuk uji kualitatif senyawa alkaloid, Meyer untuk uji kualitatif senyawa alkaloid dan FeCl_3 untuk uji kualitatif senyawa flavonoid. Bahan kimia padat yang digunakan seperti silika gel G GF₂₅₄ nomor katalog 7730, Silika gel G 60 nomor katalog 7733, dan silika gel G 60 nomor katalog 7734 untuk adsorben kolom kromatografi dan plat KLT.

C. Ekstraksi, Fraksinasi dan Purifikasi

Kulit batang *aviccennia* spp. yang sudah dihaluskan dan dikeringkan dimaserasi selama 24 jam dengan etanol sebanyak 3 kali pada suhu kamar. Hasil maserasi setelah disaring menggunakan penyaring Buchner dan dievaporasi pada tekanan rendah sampai diperoleh ekstrak kering. Fraksinasi dan purifikasi dilakukan yang bertujuan untuk mendapatkan senyawa murni dari ekstrak yang diperoleh. Metode fraksinasi yang

dapat digunakan yaitu Kromatografi Kolom Vakum (KKV) dan Kromatografi Kolom Tekan (KKT).

D. Uji Komponen Golongan Senyawa metabolit sekunder

Uji kandungan golongan senyawa metabolit sekunder dilakukan dengan berdasar pada metode analisis tanaman obat (Ciulei, 1988); **Alkaloid**; Sebanyak 20 ml ekstrak diuapkan dengan pemanas air. Larutan disaring ditambah 10 mL asam klorida 10%. Larutan dibasakan dengan amoniak dan diekstraksi dengan dengan kloroform. Ekstrak kloroform diuapkan dan ditambahkan 1,5 ml asam klorida 2%. Selanjutnya ditambahkan 2 tetes pereaksi Meyer, adanya alkaloid diidentifikasi dengan terbentuknya endapan warna putih; **Flavonoid**; Sebanyak 1 ml ekstrak ditambahkan 2 ml tanol 95%, 0,5 gram serbuk seng dan 2 ml asam klorida 2 N. Diamkan larutan selama 1 menit dan kemudian ditambahkan 2 ml asam klorida pekat. Adanya flavonoid diidentifikasi dengan terbentuknya larutan berwarna kuning sampai jingga. **Terpenoid dan Steroid**; ekstrak dilarutkan dengan asamasetatglasial kemudian diuapkan sampai kering dan ditambahkan dengan asam sulfat pekat. Adanya terpenoid ditandai dengan terbentuknya warna jingga hingga merah dan steroid ditandai adanya warna hijau sampai biru.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kulit batang *aviccennia* spp. yang sudah dihaluskan dan dikeringkan sebanyak 3,30 kg dimaserasi selama 24 jam sebanyak 3 kali pada suhu kamar masing-masing dengan 10 liter etanol. Hasil maserasi setelah disaring menggunakan penyaring Buchner dan dievaporasi pada tekanan rendah diperoleh maserat sampai ekstrak kering

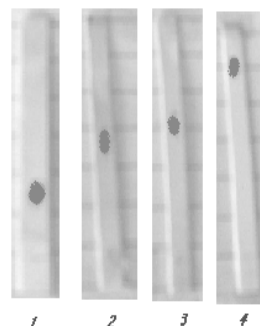
sebanyak 17,90 g. Ekstrak etanol dari kulit batang *aveceniia* spp. ditimbang sebanyak 8.90 gram kemudian diimpreknasi dengan silikagel kasar. Sampel yang sudah diimpreknasi kemudian di fraksinasi menggunakan KKV diameter 5.5 cm dengan fasa diam silika gel G GF₂₅₄ 100 g dan eluen n-heksan, n-heksan-etil asetat, etil asetat, kloroform, aseton, dan metanol dengan kepolaran yang terus ditingkatkan dan diperoleh 23 fraksi. Fraksi-fraksi yang diperoleh selanjutnya di KLT. Hasil KLT menunjukkan pola fraksinasi komponen ekstrak yang terfraksinasi berddasarkan tingkat pelarut atau eluen yang dielusikan pada kolom kromatografi. Fraksi-fraksi yang diperoleh sebanyak 23 fraksi selanjutnya di KLT dan berdasarkan pola KLT dimana fraksi yang mempunyai pola noda dan nilai Rf yang sama di gabung sehingga diperoleh 6 fraksi gabungan utama.

Keenam fraksi gabungan beserta ekstrak etanol dilakukan uji pendahuluan penapisan kandungan senyawa kimia dengan menggunakan pereaksi. Hasil penapisan kandungan kimia ekstrak etanol awal kulit batang *avicennia* spp. beserta keenam fraksi gabungan hasil fraksinasi dengan KKV yang diuji menggunakan pereaksi uji alkaloid, steroid dan terpenoid serta flavonoid. Hasil menunjukkan adanya kandungan golongan senyawa metabolit sekunder alkaloid, terpenoid, flavonoid, dan steroid (Tabel 1).

Tabel 1. Kandungan Kimia Ekstrak Kulit batang *Avicennia* spp.

Ekstrak/ Fraksi	Kandungan golongan Senyawa			
	terpenoid,	Steroid	Alkaloid	flavonoid,
Ekstrak Etanol	+	+	-	+
A	+	+	-	-
B	+	+	-	+
C	-	-	+	+
D	-	+	+	-
E	-	-	+	+
F	-	-	-	+

Pada fraksi gabungan utama B krude kristal yang terbentuk diambil dan direkris dengan cara dilarutkan dengan pelarut yang hanya melarutkan zat pengotor (n-heksan dan sedikit etil asetat) selanjutnya disaring/dipisahkan. Endapan yang tersisa/residu selanjutnya dilarutkan dalam kloroform kemudian disaring dan dipisahkan kembali. Filtrat yang diperoleh kemudian dibiarkan mengering dan terbentuk Kristal berwarna putih berbentuk jarum. Hasil KLT memiliki pola noda dan nilai Rf yang sama dengan senyawa 1. (yang diperoleh dari endapan fraksi 5). Selanjutnya Kristal yang diperoleh setelah diKLT ternyata homogen dan menunjukkan satu noda pada beberapa system eluen seperti pada Gambar 1. Dari hasil uji titik leleh senyawa tersebut diperoleh titik leleh 164°C, dengan ketajaman titik leleh 164-165°C larut dalam kloroform dan etilasetat.



Gambar 1. Kromatogram KLT Isolat 1

Keterangan:

1. eluen etilasetat:n-hexan 7:3 Rf 0.25
2. eluen aseton kloroform 8:2 Rf 0.43
3. eluen aseton:etilasetat 8:2 Rf 0.52
4. eluen etil:n-hexan 7:3 Rf 0.80

Pengukuran Spektroskopi

Senyawa 1 yang berdasarkan uji KLT tiga sistem eluen menunjukkan senyawa murni, sebelumnya telah dilakukan uji bioaktif terhadap bakteri *Aeromonas hidophyla* dan menunjukkan

ada aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophyla*. Pengukuran dengan spektrometer GC-MS ternyata senyawa 1 masih menunjukkan adanya peak yang menunjukkan puncak serapan yang mengindikasikan komponen senyawa seperti pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil GC MS senyawa 1.

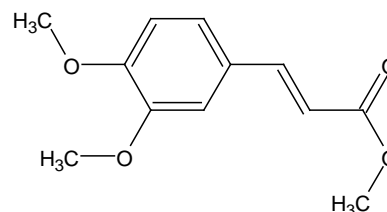
Peak	Retention Time (RT)	Area %	Senyawa dugaan
1	21.112	15.57	3-[3,4-dimethoxyphenyl]-methyl ester
2	21.327	14.15	3,4-dimethoxycinnamic acid

PEMBAHASAN

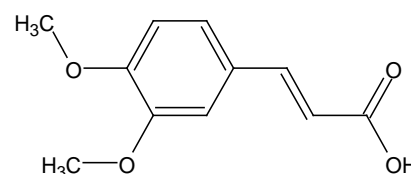
Hasil fraksinasi dan purifikasi ekstrak etanol kulit batang tumbuhan ini dan berdasarkan pola KLT menunjukkan variasi komponen yang banyak dan beragam. Semua fraksi yang tergolong dalam enam fraksi gabungan utama menunjukkan sifat menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophyla*. Hal ini menunjukkan banyak komponen senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada jaringan tumbuhan ini yang berpotensi sebagai anti bakteri yang potensial untuk ditelusuri, diisolasi, serta dikembangkan untuk keperluan komersial sebagai bahan fitofarmaka.

Fraksinasi lebih lanjut fraksi gabungan (A) dengan menggunakan alat fraksinasi kolom kromatografi tekan berhasil diidolasi satu senyawa. Isolat ini mempunyai nilai Rf pada plat kromatografi lapis tipis (KLT) masing-masing Rf 0.25 dengan eluen etilasetat:n-hexan 2:8, Rf 0.60 eluen n-hexane:aseton 7:3 Rf 0.80 eluen etil:kloroform 8:2. Melihat perbandingan eluen yang digunakan menunjukkan bahwa isolat 1 kepolarannya cukup tinggi. Dari hasil pengukuran titik leleh dengan elektrotermal menunjukkan rentang titik leleh yang cukup tajam dari 164-165⁰C yang mengindikasikan isolat 1 cukup

murni. Hasil pengukuran dengan GC-MS dengan menggunakan data perbandingan menunjukkan adanya dua komponen senyawa dugaan yang memungkinkan terdapat pada isolat 1. Kedua komponen ini strukturnya molekulnya seperti pada Gambar 2.



(i) 3-[3,4-dimethoxyphenyl]-methyl ester



(ii) 3,4-dimethoxycinnamic acid

Gambar 2. Komponen senyawa pada isolat 1

Berdasarkan hasil analisis dengan KLT gambar 1. menunjukkan bahwa senyawa yang diperoleh memiliki tingkat kepolaran yang tinggi. Dari hasil pengujian dengan pereaksi terhadap ekstrak awal sebelumnya menunjukkan adanya alkaloid, terpenoid, dan flavanoid. Karena senyawa yang diperoleh kepolarannya tinggi, sehingga yang paling mendukung dari data identifikasi adalah senyawa golongan fenil propanoid seperti pada gambar 2. senyawa ini adalah merupakan salah satu prekursor pada metabolisme pembentukan senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid banyak yang telah ditemukan dan sebahagian besar memiliki potensi sebagai senyawa bioaktif atau memiliki aktivitas yang dapat bermanfaat sebagai obat. Seperti

pada yang ditemukan pada kulit batang tumbuhan *Avicennia spp* yaitu senyawa (i) dan (ii) yang memiliki gugus fungsional organik lebih dari satu. Seperti adanya gugus fungsi metoksi, ester, dan aromatic mendukung aktivitas senyawa pada isolate 1.

Senyawa pada isolate satu yang merupakan senyawa metabolit sekunder tersebut diduga sebagai produk detoksifikasi dari timbunan metabolit yang beracun dan tidak dapat dibuang oleh tumbuhan sehingga dengan cara lain ditimbun dalam jaringan tertentu dari tumbuhan (Paolo Manitto, 1992). Produk metabolisme detoksifikasi ini diduga akibat kemampuan tumbuhan menghasilkan senyawa kimia sebagai senjata untuk mempertahankan diri dari serangan hama dan faktor lingkungan yang hampir terjadi semua pada tumbuhan. Jenis senyawa metabolit sekunder yang dimetabolisme tergantung pada faktor biogenetik tumbuhan tersebut. Senyawa kimia tersebut seperti alkaloid, flavonoid, triterpenoid, tanin, dan saponin. Senyawa-senyawa inilah yang berperan sebagai bahan aktif yang dapat kemungkinan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophyla*. Menurut Jawetz *et al.* (2001) pertumbuhan bakteri yang terhambat atau kematian bakteri akibat suatu zat antibakteri dapat disebabkan oleh penghambatan terhadap sintesis dinding sel, penghambatan terhadap fungsi membran sel, penghambatan terhadap sintesis protein, atau penghambatan terhadap sintesis asam nukleat.

Menurut Correl *et al*, 1995 tumbuhan mangrove kaya akan senyawa steroid, saponin, flavonoid dan tannin. Senyawa bioaktif tersebut misalnya saponin telah digunakan sebagai bahan baku untuk pembuatan hormon steroid sintesis. Diduga ketiga senyawa metabolit

sekunder ini yang terdapat pada tumbuhan *Avicennia spp.* yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophyla*. Mekanisme penghambatan yang mungkin terjadi adalah penghambatan terhadap sintesis dinding sel yang didasarkan pada adanya kandungan flavonoid yang merupakan senyawa fenol (Harborne, 1987). Senyawa fenol dapat bersifat koagulator protein (Dwidjoseputro, 1994). Protein yang menggumpal tidak dapat berfungsi lagi, sehingga akan mengganggu pembentukan dinding sel bakteri. Selain itu, juga diduga berkaitan dengan adanya senyawa alkaloid yang juga dapat mempengaruhi dinding sel.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini memberikan data empiris yang mendukung adanya golongan senyawa fenil propanoid yang potensial menghambat pertumbuhan atau sebagai anti bakteri khususnya bakteri *Aeromonas hidrophyla*.

DAFTAR PUSTAKA

- Alimuddin dan Linda, H. 2007. Isolasi Senyawa Antimikrobia dari Nipah (*Nypa fructicans*) dan Karakterisasi Parsial Senyawa Aktifnya Secara KLT-Bioautografi. Laporan Hasil Penelitian,
- Alimuddin, Rante, H, 2006. Karakterisasi Parsial Senyawa Antivibriososis dari Tumbuhan Mangrove (*Rhizophora spp*), Laporan Hasil Penelitian, DP3M DIKTI.
- Angka, S.L., Yunita, I., Sutarna, I.K.J. 2002. Aktivitas Antibakteri dari Fitofarmaka secara *In Vitro* dan *In Vivo* terhadap *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Lele Dumbo. J.Mikrobiologi Indonesia 7 (2): 47-50.

- Ansori, 2003. Penyakit Ikan dan Pengendaliannya. Makalah Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV, Purwekerto
- Bracket, J.B., and Little, J.M. 1994. Recent Trend in Fish Chemotherapeutans. Aquaculture Toward The 21 st Century. Proc. INFOFISH-AQUATECH, Int.Conf. Colombo, 225-228.
- Brock, J. 1986. An Introduction to Aquaculture Disease. Aquaculture Vol.10:3 –6
- Chanratchakool, P., Turnbull, J.F., Smith, S.F., Limsuwan, C. 1995. Health management in Shrimp Ponds. 2nd Edition. Aquatic Animal Health Research Institute. Dept. of Fisheries. Kasetsart University Campus. Bangkok: 111
- Correl, D.S, Schubert, B.G, Gentry, H.S, and Hawley, W.D. 1995. The Research for Plant Precursors of Cortisone. Economic Botany 52: 307-375.
- Devaraja, T.N., Ota, S.K., Shubha, G., Karunasagar, I., Tauro, P. 1998. Immunostimulation of Shrimp/Fish through Oral Administration of *Vibrio* bacteria and Yeast Glucan. Di dalam: Flegel TW (ed). Advances in Shrimp Biotechnology. Bangkok: National Centre for Genetic Engineering and Biotechnology: 167-170
- Darminto, dkk., 2009. Potensi Ekstrak Etanol Kulit Batang Tumbuhan Mangrove (*Avicennia* spp.) dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Aeromonas hydrophyla*. Jurnal Bionature, v.10. Nomor 2.
- Harborne JB., 1987. *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Diterjemahkan oleh Padmawinata K & Soediro. Penerbit ITB, Bandung.
- Haryanti, Sugama, K., Tsamura, S., Nishijima, T. 2000. *Vibriostatis Bacterium Isolated from Seawater: Potential as Prebiotic Agent in the Rearing of Penaeus monodon* larvae. Ind. Fish Res J 6: 26-32
- Iguchi, S.M., Aikawa, Tersebut dan Matsumoto, J.J, 1982. Antibacterial Activity of Snail Mucus Mucin. Comparative Biochemistry and Physiology, 72A: 571-574.
- Jawetz E, Melnick GE, and Adelberg CA. 2001. *Mikrobiologi kedokteran*. Edisi I. Diterjemahkan oleh Penerjemah Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Salemba Medika, Surabaya.
- Kamiso, H.N, 2004. Status Penyakit Ikan dan Pengendaliannya. Makalah Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV, Purwekerto.
- Linington, R.G., Roberstson, M.G., Gauthier, A., Finlay, B.B., Soest, R., Anderson, R.J. 2002. Caminoside, An Antimicrobial Glycolipid Isolated from the Marine Sponges *Caminus spaeroconia*. Org Lett. Nov 14 Nov; 4 (23). 4089-4092.
- Muliani, Suryati, E., Ahmad, T. 1998. Penggunaan ekstrak Spons untuk Penanggulangan Bakteri *Vibrio* spp pada Udang Windu (*Penaeus monodon* Fab.) 1998. Prosiding Seminar Bioteknologi Kelautan, Ujung Pandang, 1998.
- Paolo Manitto, 1992. *Biosintesis Produk Alami*, terjemahan Koensoemardiyah cetakan pertama. Semarang: IKIP Semarang Press.
- Purnobasuki, H, 2005. Potensi Mangrove sebagai Tanaman obat. Biota Vol IX (2). 125-126.
- Tahir, A dan Secombes, C.J, 1996, Immunomodulation of Flat Fish (*Limanda limanda* L). Fish and Shellfish Immunology, 135-146